1. Einleitung

Der in Indien beheimatete Zebrabärbling (*Danio rerio*) gehört zur Familie der *Cyprinidae*. Er ist relativ klein und robust, der Sauerstoffbedarf ist gering. Der Fisch zeigt gute Reproduktions- und Wachstumsleistungen und ist zudem kein saisonaler Laicher, so daß man theoretisch täglich Eier erhalten kann. Seit 1930 wird er aufgrund seiner leichten Handhabung, seines kurzen Generationsintervalls und seiner durchsichtigen Eier als Versuchsfisch im Labor für verschiedene Fragestellungen, vor allem in der Embryologie, verwendet. Im Rahmen der EU-weiten Harmonisierungsbetrebungen bezüglich der Testrichtlinien des Gesetzes zum Schutz vor gefährlichen Stoffen (ChemG; ChemG Anmelde- und PrüfnachweisV, zuletzt geändert durch Gesetz vom 14. Mai 1998 (BGBI. IS. 3512)) wird der Zebrabärbling als Testfisch favorisiert (HAMBURGER, 1983). Für Toxizitätstests nach dem Pflanzenschutzmittelgesetz ist diese Fischart ebenfalls im Einsatz. Aufgrund seiner Eigenschaften ist der Zebrabärbling besonders für langfristige Testreihen relevant, die auch Reproduktionsleistungen miterfassen.

Während die Standardisierung des Testverfahrens für derartige Tests weitgehend abgeschlossen wurde, ist eine Standardisierung des Testorganismus selbst bisher kaum erfolgt. Bei der Evaluierung der Leistungssicherheit von Zebrabärblingen in Toxizitätstests mit Zinksulfat konnte SONDERMANN (1990) einen signifikanten Einfluß der Herkunft der Versuchsfische auf die Testergebnisse nachweisen. Weiterhin zeigten VON HERTELL et al. (1990) und VON HERTELL (1991), daß bei den verfügbaren Zebrabärblingspopulationen die Variabilität der untersuchten Merkmale (Gelegegröße, Laichintervall, Schlupfrate, Überlebensrate der Jungfische etc.) selbst unter unbelasteten Wasserverhältnissen als zu hoch angesehen werden muß, um den Einfluß einer Chemikalie von der genetisch bedingten Leistungsschwankung in dem vorgesehenen Life-Cycle-Test trennen zu können. Um die Reproduzierbarkeit von Fischtesten zu erhöhen, ist somit auch die Standardisierung der Testfische hinsichtlich Leistungshöhe und -konstanz unabdingbar. Die Erzeugung isogener Fische durch die Kreuzung homozygoter Zuchtlinien ist ein möglicher Weg für die Bereitstellung standardisierter Testfischpopulationen. Auf dem Weg der künstlich induzierten Gynogenese lassen sich bei Fischen innerhalb von zwei Generationen homozygote Zuchtlinien erstellen. In Abfolge einer Generation können nach einer Scheinbefruchtung von Eiern mit genetisch inaktiviertem Sperma und einer nachfolgenden Unterdrückung der ersten mitotischen Teilung durch eine Schockbehandlung homozygote Tiere erstellt werden. Durch die gynogenetische Reproduktion entsprechender homozygoter Weibchen lassen sich in der 2. Generation homozygote Nachkommen aus diesen Weibchen produzieren, die dengleichen Genotyp wie ihre Mutter aufweisen und untereinander genetisch identisch sind.

Seit es STREISINGER et al. (1981) gelang, homozygote isogene Zuchtlinien bei Zebrabärblingen (*Danio rerio*) über eine künstlich induzierte Gynogenese herzustellen, wartete man

erfolglos auf eine geglückte Wiederholung der Versuche durch andere Wissenschaftler. So benutzte HÖRSTGEN-SCHWARK (1993) die gleiche Methode wie STREISINGER et al. (1981), konnte aber nur männliche homozygote gynogenetische Nachkommen erzeugen. HÖRSTGEN-SCHWARK (1993) konnte keinen Einfluss der Herkunft, Fütterung, und der Erbrütungs- und Aufzuchtbedingungen auf die Geschlechterverhältnisse feststellen. Da ohne weibliche homozygote gynogenetische Zebrabärblinge keine homozygoten Zuchtlinien entwickelt werden können, wurde die Erstellung solcher gynogenetischen Tiere zu einem Schwerpunkt der vorliegender Arbeit.

Die induzierte Gynogense zur Entwicklung homozygoter Zuchtlinien beim Zebrabärbling und Versuche zur Erstellung haploider androgenetischer Fische als ersten Schritt im Rahmen einer androgenetischen Reproduktion für homozygote Zuchtlinien war deshalb das Ziel dieser Forschungsarbeit.

2. Literaturübersicht

2.1. Der Zebrabärbling als Versuchsfisch

Zur Zeit sind Fische zahlenmäßig die dritthäufigste Versuchstiergruppe. Sie werden hauptsächlich in Toxizitätstests (60%) eingesetzt, von denen die Mehrheit gesetzlich gefordert wird. Nur 20% der Versuchstiere, die für standardisierte Toxizitätstests verwendet werden, sind Säugetiere (BONGERS et al., 1999). Aus zwei Gründen werden Fische als Labortiere für standardisierte Toxizitätstests in zunehmendem Maße wichtig. Erstens besteht ein genereller Trend zur Verwendung niederer Wirbeltiere, da die Gesetzgebung in der Europäischen Gemeinschaft in Richtung auf den Einsatz von Tieren mit niedrigem Grad an Neurosensitivität tendiert (EC Council Directive 86 / 609 / EEC 1988). Da zweitens die Regularien bezüglich des Umweltschutzes sich zunehmend anspruchsvoller gestalten, werden mehr Sicherheitstests sowohl für neu entwickelte als auch bereits auf dem Markt existierende Chemikalien gefordert (BONGERS et al., 1999).

Fische eignen sich aufgrund ihrer Position am Ende der aquatischen Nahrungskette und ihrer im Vergleich zu Säugern höheren Empfindlichkeit gegenüber Giften gut zum Einsatz in Toxizitätstest (JUNG, 1976; HAIDER, 1978). Sie sind besonders gut als Indikatoren geeignet, da ihr Nervensystem fähig ist, kleinste Schadstoffkonzentrationen in Gewässern zu registrieren.

Viele Fischarten werden als Testfische eingesetzt. Die Regenbogenforelle (*Oncorhynchus mykiss*) wird in sehr vielen Ländern (z. B. EU, USA) als Testfisch genutzt, sei es in Form ihrer Eier und Larven oder in Adult-Tiertests (SONDERMANN, 1990). Als typischer Kaltwasserfisch benötigt die Forelle aber im Vergleich zu anderen Testfischarten eine niedrigere Testtemperatur. Für Life-Cycle-Tests ist sie wegen der Körpergröße der Elternfische und ihres langen Generationsintervalls nicht einsetzbar. Dies gilt auch für den vielfach verwendeten Karpfen (*Cyprinus carpio*) (SONDERMANN, 1990). Die Goldorfe (*Leuciscus idus*) wird ausschließlich in Deutschland als Testfisch genutzt. Die Empfindlichkeit von Goldorfen gegenüber Chemikalien entspricht in etwa dem Niveau der Regenbogenforelle. Die Einsatzmöglichkeiten der Goldorfe beschränken sich auf kurz- und mittelfristige Toxizitätstests, da für langfristige Tests, die auch die Fortpflanzung beinhalten, sowie für Ei-Larven-Tests, diese Fischart aufgrund ihres langen Generationsintervalls und der Größe der adulten Tiere nicht einsetzbar ist (HAMBURGER, 1982).

Der Zebrabärbling (*Danio rerio*)* ist ein favorisierter Testorganismus für ökotoxikologische

*: Bis 1993 wird der Zebrabärbling als *Brachydanio rerio in der Literatur* geführt, danach als *Danio rerio* (MEYER et al., 1993).

Testverfahren, deren Durchführung im Chemikaliengesetz vorgeschrieben ist. Der Fisch wird entweder als Indikator bei akuter Gewässerbelastung oder zur Bestimmung der Gefährlichkeit von Schadstoffen benutzt (SONDERMANN, 1990). Der in Indien beheimatete Zebrabärbling (*Danio rerio*) gehört zur Familie der *Cyprinidae*. Er ist relativ klein und wird bereits im Alter von 2,5 bis 4,0 Monaten geschlechtsreif bei einem Körpergewicht von 0,6 bis 1,1 g. Der Zebrabärbling ist ein Dauerlaicher mit einer Zwischenlaichzeit von ungefähr 2 Tagen. Die Eier sind transparent. Tab. 1 zeigt eine Zusammenstellung der wichtigsten Eigenschaften des Zebrabärblings (*Danio rerio*) für den Testfischeinsatz.

Die Zebrabärblingsembryonen sind in jeder Entwicklungsphase sehr leicht zu behandeln, da sowohl die Eier als auch die Embryonen während der gesamten Embryonalentwicklung transparent sind. Aus diesem Grund ist dieser Fisch in der Embryonenforschung und in der genetischen Forschung sehr gefragt (KIMMEL, 1989; WILLIAM DETRICH III et al., 1999). Die Embryonen sind sehr einfach zu handhaben (KIMMEL et al., 1995) und haben weniger Zellen als andere Wirbeltiere (KIMMEL und WESTERFIELD, 1990). Der Zebrabärbling ist ebenfalls ein wichtiges Modell zur Untersuchung der Entwicklung der Wirbeltiere aber auch für genetische Analysen (STREISINGER et al., 1981; KIMMEL, 1989; BARINAGA, 1990; HÖRSTGEN-SCHWARK, 1993; NÜSSLEIN-VOLHARD, 1994; CONCORDET und INGHAM, 1994; DRIEVER et al., 1994; KAHN, 1994). Die Arbeitsgruppe von STREISINGER hat bisher als einzige homozygote Zuchtlinien des Zebrabärblings erstellt (STREISINGER et al., 1981). Techniken zur Steigerung der Frequenz an Mutanten (WALKER und STREISINGER, 1983; GRUNWALD und STREISINGER, 1992), zum Gen-Mapping (STREISINGER et al., 1986) und für Analysen zur Entwicklung genetischer Mosaike anhand von homozygoten Zuchtlinien (STREISINGER et al., 1989) wurden seither publiziert. Außerdem sind die F_1-Tiere von mutierten Fischen genutzt worden, um Embryonen mit zygotisch rezessiv letalen Mutationen zu erhalten (GRUNWALD et al., 1988; FELSENFELD et al., 1991).

2.2. Toxizitätstest mit Zebrabärblingen

Mit Hilfe von Fischtests kann die Schädlichkeit von Einzelstoffen oder Stoffgemischen überprüft werden. Auch können die Fischtests sowohl von Einleitern als auch von Wasserbenutzern zu kontinuierlichen Kontroll- und Überwachungszwecken genutzt werden (SONDERMANN, 1990). Die ersten Toxizitätstests an Fischen in Abwässern aus Industrie und Haushalten sind schon im 19. Jahrhundert in Europa dokumentiert worden (VON HERTELL, 1991). Mit der Zunahme der Gewässerbelastung in den 70iger Jahren des 20. Jahrhunderts ist eine gesetzliche Regelung zum Schutz vor gefährlichen Stoffen erforderlich geworden. In dem 1982 in Kraft getretenen Chemikaliengesetz (Umweltbundesamt, 1982) wird in Abhängigkeit von der in Umlauf gebrachten Chemikalienmenge der Test auf akute Fischtoxizität (Grundstufe) oder eine langfristige Prüfung auf chronische Effekte, die sich vor

Tabelle 1: Zusammenstellung der wichtigsten Eigenschaften des Zebrabärblings (*Danio rerio*)

Haltungsparameter	Literaturquelle
- geringer O_2-Bedarf	HISAOKA & FIRLIT, 1962
- 20-27°C Haltungstemperatur	BRESCH, 1983; NAGEL, 1986
- pH-Wert 6-8	BRESCH, 1983; NAGEL, 1986
- mit allen gängigen Lebend- und Trockenfutter-mitteln zu ernähren	BRESCH, 1983; NAGEL, 1986
Größe, Geschlechtserkennung, Chromosomensatz	
- ♂ 0,6 g Körpergewicht bei Geschlechtsreife	PIRON, 1978
- ♀ 1,1 g Körpergewicht bei Geschlechtsreife	PIRON, 1978
- Bis zu 4,5 cm Körperlänge bei Geschlechtsreife	PIRON, 1978
- ♀ mit deutlicher Wölbung des Bauches,	STERBA, 1968
- ♂ schlanker	STERBA, 1968
- ♀, ♂ gleiche Körperfarbe	RIEHL & BAENSCH, 1984
- 2n = 50 Chromosomensatz	ENDO & INGALLS, 1968
Reproduktionsparameter	
- Eintritt der Geschlechtsreife nach 2,5 - 4,5 Monate	WESTERFIELD, 1993
- Asaisonales Ablaichen	WESTERFIELD, 1993
- 2,0 Tage Zwischenlaichzeit	VON HERTELL et al., 1991
- Eier transparent	WESTERFIELD, 1993
- Eizahl 24,3 / pro ♀ / Tag (Alter 12 Monate)	EATON & FARLEY, 1974
- Eizahl 60,4 / pro ♀ / Tag (Alter 16 Monate)	EATON & FARLEY, 1974
- Maximal 1109 Eier/ pro ♀ / Tag	HISAOKA & FIRLIT, 1962
- Anpaarungsverhältnis: ♂ : ♀ = 2-3 : 1 in Ablaichgruppen	HISAOKA & FIRLIT, 1962; NAGEL, 1986; WESTERFIELD, 1993
- Abstreifbare Gonadenprodukte	WESTERFIELD, 1993
Erbrütung	
- 25 – 27°C Erbrütungstemperatur	BRESCH, 1986; NAGEL, 1986; NIIMI & LAHAM, 1975; WESTERFIELD, 1993;
- Schlupf nach 60 – 96 Stunden (25 - 27°C)	ROOSEN-RUNGE, 1939; BLUMENKRANTZ, 1954; HISAOKA & BATTLE, 1958; NIIMI & LAHAM, 1975; WESTERFIELD, 1993
- Schlupfrate 30 – 70%	ANFERSON & BATTLE, 1967
- Geschlechtsdifferenzierung nach 40 Tagen abgeschlossen (bei Wassertemperatur von 26°C)	TAKAHASHI, 1977
- Anfütterung mit Tetra Min Baby	BRESCH, 1983; NAGEL, 1986